



Bioprospek

<https://fmipa.unmul.ac.id/jurnal/index/Bioprospek>



PENETAPAN KADAR GENISTEIN DALAM EKSTRAK METANOL BIJI KEDELAI *Glycine max L. Merr.* VARIETAS GROBOGAN MENGGUNAKAN METODE KLT DAN HPLC

Retno Aryani¹, Pudji Astuti², Soekarti Moeljopawiro³, Laurentius Hartanto Nugroho⁴

¹ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Mulawarman

² Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

^{3,4} Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

INFO ARTIKEL

Terkirim 4 Juni 2015
Diterima 9 Agustus 2015
Online 20 September 2015

Kata kunci.
Glycine max L. Merr.
Isoflavones genistein

Korespondensi:
retno_aryani@yahoo.co.id
bioprospek@fmipa.unmul.ac.id

ABSTRAK

Soybean (*Glycine max L. Merr.*) is one of the foodstuffs that are often consumed most of Indonesian. Soy contains phytoestrogens, which have chemical structures resemble the hormone estrogen in the body, namely the isoflavones, especially genistein. Genistein is known not only have various beneficial physiological effects but also act as an endocrine disruptor is because estrogen can play a role as well as antiestrogen activity that affects the metabolism of sex hormones and related activities biologi. The objective of this study was to know the quality of genistein in soy extracts Grobogan varieties that have been peeled the husk with Thin Layer Chromatography (TLC) and the quantity of soy extract genistein levels Grobogan varieties that have been peeled the husk with a method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The method used for extraction of isoflavones genistein is maceration. Soybean seed samples which have been hulled begins with removal of non polar compounds by extraction using n-hexane solvent extraction followed maceration using 80% methanol. The methanol extract obtained fractionated with a stationary phase of silica gel GF 254, the mobile phase toluene-ethyl acetate-aseton- formic acid 20: 4: 2: 1 (v / v). To determine whether or not a compound genistein compounds in the extract by using a comparison standard genistein further Rf sample extract compared with the price of a standard Rf. While the determination of genistein compound quantitatively with HPLC method genistein standard wear $\geq 98\%$ at a concentration of 2, 4, 6, 8, 10 ppm. The identification of genistein using Thin Layer Chromatography (TLC), shows the stains that have Rf of about 0.43. Results genistein content by HPLC showed peaks of the chromatograms that have a retention time of about 2,050 minutes. HPLC analysis results in three replication showed levels of genistein in soya bean varieties Grobogan was 1 g samples of soy extracts that have been flayed husk there was an average of 0.6356 mg genistein. In the soybean seed Grobogan varieties contains isoflavones genistein. Levels of genistein in 1 g of sample soy extracts Grobogan varieties that have been flayed epidermis was an average of 0.6356 mg genistein.

1. Pendahuluan

Kedelai (*Glycine max Merr.*) merupakan salah satu tanaman *Leguminoceae*, yang sudah dikenal dan sering dikonsumsi manusia. Masyarakat memanfaatkan kedelai sebagai makanan sehari-hari baik kedelai yang sudah diolah menjadi berbagai produk makanan maupun berupa tepung dan larutan kedelai. Beberapa waktu terakhir ini banyak dilakukan penelitian keistimewaan tanaman *Leguminoceae*. Biji, daun, dan bunganya sering dimanfaatkan manusia, bahkan penelitian berkembang sangat luas karena tanaman tersebut mempunyai sejumlah senyawa yang telah berhasil diisolasi dan mempunyai banyak peran penting dalam kehidupan manusia. Bidang farmakologi dan kedokteran banyak dimanfaatkan sebagai tanaman dalam pencegahan dan terapi penyakit.

Salah satu aspek penting dari kedelai sebagai sumber pangan fungsional adalah kandungan isoflavonnya merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman melalui sintesis oleh *2-hydroxyisoflavone synthase* (IFS). Senyawa tersebut tidak disintesis oleh mikroorganisme. Oleh karena itu, tanaman merupakan sumber utama penghasil senyawa isoflavon di alam. Kedelai dinilai memiliki kandungan isoflavon cukup tinggi, dan terbanyak terdapat pada biji, khususnya pada bagian hipokotil (*germ*) yang akan tumbuh menjadi tanaman. Sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama (Anderson and Garner, 1997). Jumlah dan komposisi isoflavon dalam biji bervariasi, bergantung pada bagian morfologi biji (kotiledon, hipokotil, dan integument), genotipe, dan lingkungan budi daya (Chiari *et al.*, 2004).

Isoflavon yang ditemukan paling banyak dalam kedelai berupa genistein dan daidzein. Oleh karena itu isoflavon sebagai senyawa bioaktif dalam suplemen makanan yang berfungsi untuk mencegah beberapa penyakit kronis, seperti kardiovaskular, mencegah osteoporosis, dan antioksidan. Bahkan dilaporkan pula pentingnya untuk mencegah penyakit kanker (Hoeck *et al.*,

2000; Primomo *et al.*, 2005). Hal tersebut dikarenakan genistein dan daidzein adalah termasuk golongan phenol heterosiklik dengan struktur yang sama dengan estrogen sehingga isoflavon sering disebut dengan fitoestrogen (Markham *et al.*, 1978; Piskula *et al.*, 1999). Oleh karena itu isoflavon mungkin tidak hanya mempunyai bermacam-macam efek fisiologis yang menguntungkan tetapi juga beraksi sebagai *endocrine disruptor* disebabkan karena dapat berperan seperti estrogen maupun mempunyai aktifitas antiestrogen yang mempengaruhi metabolisme hormon seks dan yang berhubungan dengan aktifitas biologi (Lee *et al.*, 2004; Izumi *et al.*, 2007). Dengan banyaknya manfaat kedelai dan masyarakat yang memanfaatkan kedelai sebagai makanan sehari-hari, maka untuk memenuhi kebutuhan industri pangan berbahan baku kedelai, beberapa varietas unggul kedelai lokal dilepas akhir-akhir ini di antaranya adalah Argomulyo, Bromo, Burangrang, Wilis, Anjasmoro dan Grobogan (Ginting, 2010). Kedelai lokal varietas Grobogan adalah varietas kedelai yang hasilnya mencapai 2,2 ton per ha jauh di atas produktivitas di tingkat Nasional yang hanya mencapai 1,49 ton per ha. Varietas ini mempunyai keunggulan yakni umur pendek (76 hari), ukuran polong besar, bobot biji yang besar (18 g / 100 biji), produksi tinggi, kandungan protein mencapai 43,9 persen yang lebih tinggi dibanding dengan kedelai impor maupun varietas Wilis yang sudah lama dibudidayakan petani dan daun rontok saat jelang panen (Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, 2008). Dengan adanya jenis varietas kedelai yang banyak itu, Barners (1998) menyebutkan bahwa kandungan isoflavon pada biji kedelai berkisar antara 0,5-2 mg/g tergantung varietasnya. Hasil analisis awal pada varietas Kaba untuk genistein 0,021%, varietas Ijen mengandung genistein 0,053% dan varietas Anjasmoro mengandung genistein 0,11%.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas genistein pada ekstrak kedelai varietas Grobogan yang telah dikupas kulit arinya dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kuantitas kadar genistein ekstrak kedelai varietas Grobogan yang telah dikupas kulit arinya dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

2. Metode Penelitian

Bahan

Kedelai diperoleh dari Balitkabi (Balai Penelitian Aneka Tanaman Kacang dan Umbi) di Malang Indonesia, larutan standart isoflavon-genistein (Sigma Chemical Co.), metanol p.a (E. Merck), heksana p.a (E. Merck), etil asetat p.a (E. Merck), toluen p.a (E. Merck), aseton p.a (E. Merck), asam formiat p.a (E. Merck), lempeng silica gel 20x10.

Alat

Blender, oven, beker gelas, erlenmeyer, pipet ukur, mikropipet 10 μ L, gelas ukur, bejana kromatografi, lemari pendingin, alat berupa HPLC Shimadzu LC10 Detector HPLC-UV Shimadzu RF 535.

Ekstraksi Kedelai

Ekstrak kedelai dibuat dengan menggunakan metode maserasi dengan methanol. Cara pembuatan ekstrak kedelai terdiri dari 3 tahap, yaitu pengeringan, ekstraksi, dan evaporasi. Tahap pengeringan diawali pencucian biji kedelai. Biji kedelai (sample basah) dikuliti kulit arinya dulu kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40-60⁰C. Setelah kering, dilakukan proses ekstraksi dengan penggilingan kedelai menggunakan alat penggilingan sampai halus. Serbuk kedelai (sample kering) sebanyak 100 gram diekstraksi atau dihilangkan lemaknya dengan direndam dalam 200 ml n-heksan selama \pm 4-5 jam. Bubuk kedelai tanpa lemak dikeringkan semalam. Bubuk kedelai bebas lemak (\pm 100 gram) dicampur dengan methanol 80% dengan perbandingan bubuk kedelai bebas lemak dengan metanol 500

mL (1:5) diaduk, didiamkan selama 2 x 24 jam. Rendaman tersebut kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat ditampung dan bagian padat direndam lagi dengan dengan methanol selama 24 jam kemudian disaring. Kedua filtrat dikumpulkan kemudian dikering anginkan sampai didapat ekstrak pekat kemudian ekstrak ditimbang. Ekstrak yang diperoleh dimasukkan dalam botol dan disimpan dalam lemari pendingin. Selanjutnya ekstrak kering dianalisis dengan KLT dan HPLC.

Analisis kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan menggunakan fasa diam silika gel GF 254, fasa gerak toluen – etil asetat – aseton – asam format (20:4:2:1) (Yuan, *et al.*, 2006) dan penampak nodanya diperiksa dengan sinar ultra violet. Untuk mengetahui ada atau tidak senyawa senyawa genistein dalam ekstrak dengan menggunakan baku pembanding genistein standar.

Kurang lebih 1 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 ml methanol, kemudian 10 μ l ekstrak kedelai dan standar yang telah dilarutkan dalam methanol ditotolkan pada plate dan dielus selama 1 jam. Proses elusi dilakukan sepanjang 8,5 cm dalam bejana yang jenuh dengan eluen. Sebagai penampak noda digunakan ammonia solution sehingga tampak noda orange kecoklatan. Noda yang terbentuk diamati pada sinar tampak, dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm kemudian dihitung R_f-nya. Harga R_f ekstrak sampel diukur, kemudian dibandingkan dengan harga R_f standar.

Analisis kuantitatif dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Genistein standar dilarutkan dalam methanol (1 mg/ml) kemudian dibuat seri beberapa konsentrasi dengan konsentrasi 10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm, dan 2 ppm. Masing-masing ekstrak dan masing-masing standar diinjeksi 3 kali.

Analisis dengan HPLC dilakukan dengan kondisi alat sebagai berikut :

Kolom: Lichrospher^(R) 100 RP-18 (nonpolar) HP 1050 Liquid Chromatograph System equipped with a Hypersil 120-S ODS column (250 mm×4.6 mm, 10 µm) and a UV detector.

Panjang Kolom: 10 cm

Fasa Gerak: methanol:water (70:30, v/v)

Kecepatan Alir: 1 ml /menit

Volume Injeksi: 20 µL

Detektor: sinar UV pada panjang gelombang 261 nm

Suhu Oven: suhu kamar

Untuk memastikan genistein yang ada dalam campuran, maka waktu retensi kromatogram sampel dibandingkan dengan waktu retensi kromatogram standar. Data yang diperoleh berupa luas area, kemudian ditentukan nilai a , b dan r dengan membandingkan antara konsentrasi sampel (ppm) dengan luas area. Dibuat persamaan regresi linier $y = a + bx$. Ekstrak ditimbang sebanyak 3 mg dan dilarutkan dalam 10 ml methanol:air (8:2). Sampel diinjeksikan secara otomatis sebanyak 20 µL. Dimasukkan kedalam alat HPLC lalu dianalisis. Hasil analisis akan diperoleh luas area (y) yang selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier.

3. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi Kedelai

Proses ekstraksi diawali dengan pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik, dan mencegah tumbuhnya jamur atau cendawan sehingga dapat disimpan lebih lama dan tidak mudah rusak sehingga komposisi kimianya tidak mengalami perubahan. Bahan kering yang diperoleh digiling dengan blender sehingga diperoleh serbuk halus biji kedelai. Ukuran bahan yang akan diekstrak dapat mempengaruhi efisiensi ekstraksi. Ukuran bahan yang terlalu besar mengakibatkan kontak antara komponen yang akan dipisahkan lebih kecil.

Jika ukuran bahan lebih kecil, maka pelarut lebih mudah berinteraksi dengan komponen yang akan dipisahkan.

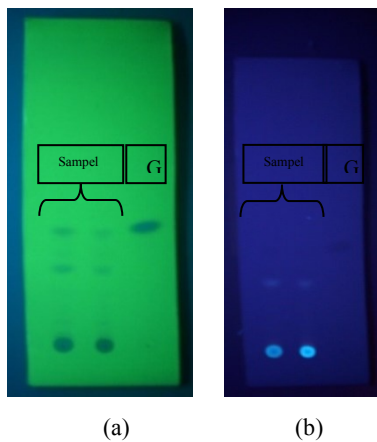
Ekstraksi dilakukan dua langkah, yaitu ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana dan ekstraksi menggunakan pelarut metanol 80%. Ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana dimaksudkan untuk memisahkan senyawa-senyawa non polar yang terdapat dalam biji kedelai. Pelarut ini termasuk pelarut non polar, sehingga dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar yang terdapat di dalamnya, seperti asam lemak, lemak dan minyak. Residu yang telah terbebas dari senyawa non polar selanjutnya diekstrak dengan maserasi menggunakan methanol 80%. Maserasi merupakan cara ekstraksi senyawa organik yang mudah dan sederhana. Bahan mentah yang akan diekstrak direndam dalam pelarut yang sesuai selama waktu tertentu. Selanjutnya filtrat dipisahkan dari residu untuk diproses lebih lanjut menjadi ekstrak yang murni.

Ekstraksi dilakukan dengan methanol dimaksudkan agar semua senyawa tersari dengan baik, karena metanol merupakan pelarut yang bersifat universal dan dapat mengekstraksi semua senyawa metabolit dan metanol merupakan pelarut optimum untuk mengekstrak isoflavon dari kedelai (Susanto *et al.*, 1998). Dari proses maserasi didapatkan hasil berupa ekstrak berwarna kuning yang mengindikasikan bahwa larutan tersebut mengandung senyawa isoflavon (Markham, 1988). Selanjutnya ekstrak digunakan untuk menganalisis kadar genistein dalam ekstrak kedelai.

Metode penetapan kadar genistein dapat dilakukan dengan cara TLC (KLT) dan HPLC dengan menggunakan detektor UV, elektrokimia, *radioimmunoassay* dan *enzyme-immunosorbant assay*. Tetapi dalam penelitian ini menggunakan 2 cara yaitu dengan metode KLT untuk mengetahui kualitas ada tidaknya genistein dalam ekstrak dan metode HPLC untuk penetapan kadar genistein di dalam ekstrak biji kedelai.

Analisis kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode KLT merupakan metode yang lebih sederhana dibanding HPLC untuk penetapan kadar senyawa aktif dari suatu ekstrak. Metode ini terhitung lebih cepat dalam preparasi dan biaya operasi yang dibutuhkan juga relatif lebih kecil walaupun sensitifitasnya kurang apabila dibandingkan dengan HPLC. Dengan penggunaan KLT penyaringan dan pemurnian ekstrak sampel lebih lanjut tidak diperlukan, ekstrak sampel langsung dapat diterapkan pada lempeng. Keuntungan analisis ini adalah mudah dilakukan, tersedianya reagen yang sensitif dan selektif yang tidak dipengaruhi oleh fase gerak. Penetapan kadar dengan menggunakan kombinasi KLT dan Densitometer (KLT Densitometri) cukup ekonomis karena menggunakan fase gerak yang sedikit, waktu yang relatif singkat dan dapat dilakukan penetapan kadar beberapa sampel secara simultan. Apabila dibandingkan dengan HPLC (KCKT) maka metode KLT tidak ada batasan fase gerak yang harus digunakan, sampel yang berupa suspensi atau keruh dapat langsung ditetapkan kadarnya, lebih cepat dan ekonomis serta memungkinkan penetapan kadar secara simultan (Yuangsoi dkk., 2008). Hasil KLT sampel ekstrak kedelai dan standar genistein diperlihatkan seperti pada gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram hasil KLT sampel ekstrak kedelai dan standar genistein dilihat dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm. (a) Deteksi dengan sinar UV 254 nm. (b) Deteksi dengan sinar UV 366 nm.

Berdasarkan deteksi yang dilakukan dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm terlihat bahwa sampel mempunyai spot sejajar dengan genistein standar dan berwarna sama dengan genistein yaitu ungu muda. Hasil kromatografi lapis tipis dengan UV 254 nm dan 366 nm diperoleh spot dengan nilai Rf seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil KLT terhadap sampel ekstrak kedelai dan genistein standar yang dideteksi dengan UV 254 nm dan 366 nm.

Bahan	Rf	Warna
Genistein standar	0,43	Ungu muda
ekstrak kedelai telah dikuliti	0,42	Ungu muda

Berdasarkan tabel 1, terlihat bahwa standar genistein mempunyai nilai Rf 0,43 dan berwarna ungu muda. Pada sampel ekstrak kedelai mempunyai warna yang sama dan nilai Rf ekstrak kedelai telah dikuliti Rf 0,42 mendekati standar genistein. Hal ini mengindikasikan bahwa sampel ekstrak tersebut mengandung salah satu jenis isoflavon yaitu genistein.

Analisis kuantitatif dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

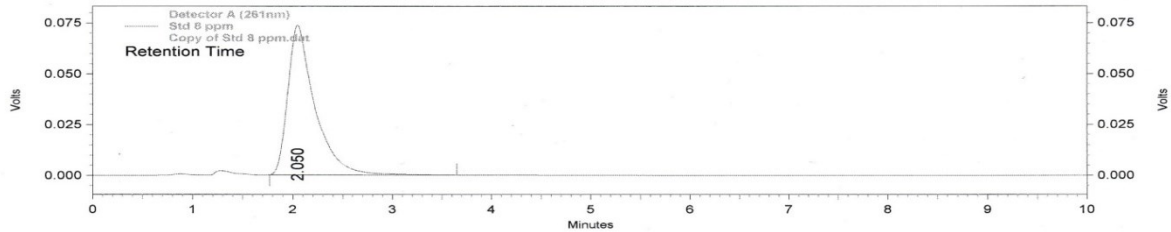
Seperti metode kromatografi yang lain, analisis HPLC dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari senyawa isoflavon standar dengan waktu retensi dari masing-masing sampel. Adanya puncak-puncak yang memiliki waktu retensi relatif sama dengan senyawa isoflavon genistein standar menunjukkan bahwa dalam sampel tersebut terdapat kandungan isoflavon genistein.

Penentuan waktu retensi senyawa genistein standar dilakukan pada hari yang sama dengan penentuan waktu retensi dari masing-masing sampel untuk meminimalkan perbedaan kondisi. Analisis kuantitatif senyawa isoflavon dilakukan dengan cara menghitung luas kromatogram. Konsentrasi senyawa isoflavon genistein dapat diketahui dengan mengalikan persen luas masing-masing senyawa isoflavon

dalam kromatogram dengan massa ekstrak yang dihasilkan.

Hasil kromatogram genistein standar dengan HPLC (Gambar 2) menunjukkan

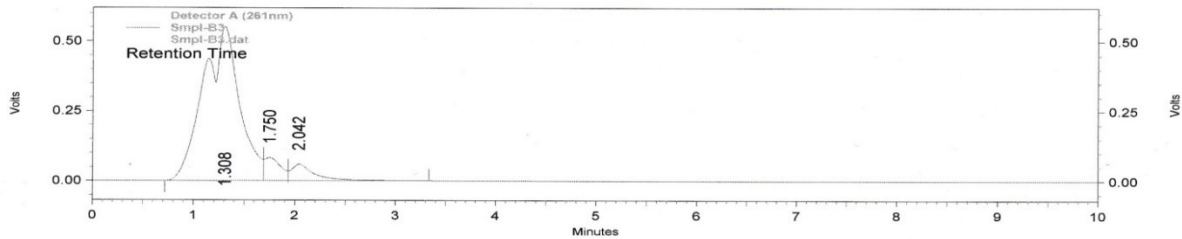
bahwa genistein mempunyai waktu retensi 2.050 menit. Kromatogram HPLC genistein standar dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram HPLC genistein standar 8 ppm.

Kromatogram pada (Gambar 3) digunakan sebagai pembandingan pada kondisi *in vivo* terlihat ada 4 puncak. Ada 1 puncak dengan waktu retensi yang sesuai dengan standar

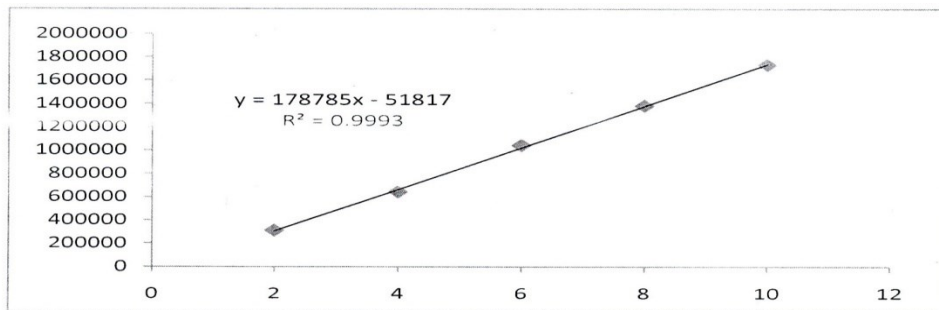
yang digunakan yaitu 2.042 menit untuk genistein. Ini menunjukkan bahwa ekstrak kedelai mengandung senyawa isoflavon terutama genistein.



Gambar 3. Pola kromatogram ekstrak kedelai dengan 1 puncak dengan waktu retensi selama 2.042 menit untuk genistein.

Analisis kuantitatif genistein dilakukan dengan cara menghitung luas kromatogram. Konsentrasi genistein dalam sampel ekstrak dapat diketahui dengan cara membandingkan luas kromatogram sampel dengan luas kromatogram standar yang konsentrasinya telah diketahui. Luas

kromatogram standar yang konsentrasinya telah diketahui selanjutnya digunakan untuk membuat kurva baku standar genistein. Data tentang konsentrasi dan luas area standar genistein dapat dilihat pada kurva baku standar pada gambar 4.



Gambar 4. Kurva baku standar genistein

Pada kurva baku standar genistein (Gambar 4) didapatkan hasil persamaan garis regresi linier kurva baku yang diperoleh adalah $y = 178785x - 51817$ dengan nilai koefisien

korelasi $R^2 = 0.9993$. Nilai koefisien korelasi mendekati 1, artinya ada korelasi positif antara kadar genistein dengan luas area kromatogram sehingga persamaan

regresi linier tersebut dapat digunakan untuk analisa kuantitatif yaitu untuk menghitung kadar genistein dalam sampel ekstrak kedelai. Penentuan kadar ekstrak kedelai dilakukan dengan interpolasi terhadap kurva standar yang selanjutnya diperoleh kadar genistein dalam sampel ekstrak kedelai dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Luas area sampel dan kadar sampel ekstrak kedelai

Luas area sampel	Kadar regresi (ppm)	Kadar Genistein dalam sampel (mg/mg ekstrak)
969357	5.7117	0.0006
979890	5.7707	0.0006
1007606	5.9257	0.0006

Kadar Genistein dalam sampel (mg/g ekstrak)	Rata-rata kadar Genistein dalam sampel (mg/g ekstrak)
0.6256	0.6356
0.6321	
0.6490	

Hasil analisis HPLC telah didapatkan hasil bahwa dalam 1 gram sampel ekstrak kedelai yang telah dikuliti kulit arinya terdapat rata-rata 0,6356 mg genistein. Menurut Wang and Murphy (1994) tinggi rendahnya kisaran hasil isoflavon disebabkan karena berbagai faktor seperti: varietas kedelai, tahap kematangan kedelai, iklim dan suhu tempat tumbuh kedelai, kondisi tanah, cara bertanam, cara pengolahan kedelai dan prosedur pemeriksaan isoflavon.

4. Kesimpulan

Standar genistein mempunyai nilai Rf 0,43, sedangkan sampel ekstrak kedelai telah dikuliti mempunyai nilai Rf mendekati standar genistein yaitu Rf 0,42. Hasil kromatogram genistein standar dengan HPLC menunjukkan bahwa genistein mempunyai waktu retensi 2.050 menit sedangkan waktu retensi ekstrak kedelai yang dikuliti yaitu 2.042 menit. Hasil analisis HPLC telah didapatkan bahwa dalam 1 gram sampel ekstrak kedelai varietas Grobogan yang telah dikuliti kulit arinya terdapat rata-rata 0,6356 mg genistein.

Daftar Pustaka

- Anderson, J.J.B., and S.C. Garner. 1997. Phytoestrogens and human. *Nutr. Today*. 32:232-239.
- Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian program Swasembada Kedelai tahun 2008.
- Barners , S. 1998. Phytoestrogens and Breast Cancer. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12(4): 559–575.
- Chiari, L., N.D. Piovesan, L.K. Naoe, I.C. José, J.M.S. Viana, M.A. Moreira, and E.G. de Barros. 2004. Genetic parameters relating isoflavone and protein content in soybean seeds. *Euphytica*. 138:55-60.
- Ginting, E. 2010. Petunjuk Teknis Produk Olahan Kedelai (Materi Pelatihan Agribisnis bagi KMPH). Balai Penelitian dan Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Malang.
- Hoeck, J.A., W.R. Fehr, P.A. Murphy, and G.A. Welke. 2000. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Sci*. 40:48-51.
- Izumi, T., Obata, A., Arii, M., Yamaguchi, H., & Matsuyama, A. 2007. Oral Intake of Soy Isoflavone Improves the Aged skin of Adult Women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53, 57-62.
- Lee, Y. B., Lee, H. J., Won, M. H., Hwang, I. K., Kang, T. C., Lee, J. Y., Nam, S. Y., Kim, K. S., Kim, E., Cheon, S. H., & Sohn, H. S. 2004. Soy isoflavones Improve Spatial Delayed Matching-to-Place Performance and Reduce Cholinergic Neuron Loss in Elderly Male Rats. *The Journal of Nutrition*, 134, 1827-1831.
- Markham, K. R., Ternal, B., Staniy, R., Geigerand, H., and Mabry, T. J. 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III, Naturally occurring flavonoid glycosides and their acetylated derivates. *Tetrahedron*, 34: 1389-1397.
- Markham, K.R. 1988. Cara Mengidentifikasi kasi Flavonoid. Alih bahasa: Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung. Piskula, M. K., Yamakoshi, J., Iway, Y. 1999. Daidzein and genistein but

- their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett*, 477: 287-291.
- Piskula, M.K., J. Yamakoshi and Y. Iwai. 1999. Daidzein and genistein but their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett*. 447: 287-291.
- Primomo, V.S., V. Poysa, G.R. Ablett, C. Jackson, and J. Rajcan. 2005. Agronomic performance of recombinant inbred line populations segregating for isoflavone content in soybean seeds. *Crop Sci*. 45:2203-2211.
- Susanto T, E. Zubaidah , dan S. B. Wijanarko. 1998. Studi tentang aktivitas antioksidan pada tempe terhadap lama fermentasi jenis pelarut dan ketahanan terhadap proses pemanasan. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi*. Yogyakarta 15 Desember 1998.
- Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem*. 42: 1666-73.
- Yuan, D. Chen, Y. Bai, X. Pan, Y. Kano, Y. 2006. TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen Sojae Praeparatum. *Asian Journal of Traditional Medicines*. 2006:1 (3-4).
- Yuangsoi, B., Jintataporn,O., Areechon, N and Tabthipwon, P.. 2008. Validated TLC-densitometric analysis for determination of carotenoids in fancy carp (*Cyprinus carpio*) serum and the application for pharmacokinetic parameter assessment, *Songklanakarinn J.Sci. Technol.*, 30 (6), 693-700.

